

명세서

발명의 명칭: HAPLN1을 포함하는 연골 관련 질환 또는 증상의 예방, 개선 또는 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 히알루론산과 프로테오글리칸 연결 단백질 1(hyaluronan and proteoglycan link protein 1; HAPLN1)을 유효성분으로 포함하는 연골 관련 질환 또는 증상의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 HAPLN1을 유효성분으로 포함하는 연골 재생용 조성물, 또는 골관절염 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 또는, 본 발명은 성장판 연골 증식용 또는 골길이 성장 촉진용 조성물, 또는 저신장증(short stature) 예방, 개선 또는 예방용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 골관절염은 환자에서 관절 통증, 관절 뻣음, 강성 및 감소된 운동 범위를 자극하며, 관절 연골 및 주요 골의 파괴를 야기하는, 변성 관절 질환이다. 10명의 성인 중 적어도 1명에서 골관절염이 발병하는 것으로 알려져 있으며(Lawrence, Felson et al. 2008), 관절 운동과 관련된 통증에 기인하여 환자의 삶의 질은 현저히 낮아진다. 골관절염은 이전에는 노화의 일반적 결과인 것으로 생각되었지만, 현재는 관절 완전성, 유전적 소인, 국소 염증, 기계적 힘, 및 세포 및 생화학적 프로세스를 포함하는 다수 인자의 복잡한 상호작용으로부터 발생하는 것으로 알려져 있다. 이의 병원성 특징으로는 하부 연골 하골의 비대 및 골극(골 돌기) 형성, 관절을 가득 채우는 관절 연골의 세포 외 기질(ECM)의 퇴행을 포함한다.
- [3] 무릎 관절에서 연골의 두께는 약 2 mm이며, 외상이나 질병 등에 의해 면적이 1 내지 4 mm² 정도 손상된 경우에는 자연 치유에 의한 재생이 가능하나, 20 mm² 정도 손상된 경우에는 자력에 의한 재생은 곤란하며, 일반적으로 큰 고통을 수반한다. 추가로, 종양, 과사 등의 여러 가지 원인에 의해 관절 연골을 완전히 잃은 경우에는 관절 기능을 복원하기 위해서, 예컨대, 인공 관절을 해당 개소에 매립하는 등의 처치가 행해지고 있다. 그러나 인공 관절은 어디까지나 관절 기능과 유사하게 인공적으로 구성된 것으로, 생체에 있어서는 이물이기 때문에, 생체 적합성을 유지하는 것은 곤란하다. 또한, 인공 관절은 생체 내에서의 엄격한 환경 하에서, 복잡한 동작이 요구되기 때문에, 20년 이상 유지시키는 것은 곤란하며, 그 소재로서 이용되고 있는 수지나 금속 등의 열화나 마모 가루의 발생 등에 의해 기능의 저하나 고통을 야기하는 경우도 있고, 내구성에 있어서도 충분하다고는 할 수 없다. 따라서, 인공 관절 치료를 대신하는 것으로서, 관절 연골 자체를 재생하는 기술이 요망되고 있다.
- [4] 또한, 최근 연구 발표에 따르면, 관절 표면을 천공하고 골 형성 인자(BMP: bone morphogenetic protein)가 함유된 콜라겐을 원하는 부위에 배치함으로써, 관절

연골의 재생을 보고한 바 있다. 그러나 재생된 관절 연골은 인접하는 기존의 관절 연골과 연속적으로 형성되지 않아, 완전한 재생이라고는 할 수 없는 것이었다. 또한, 콜라겐은 BSE(bovine spongiform encephalopathy), 소위 광우병 등의 문제로부터, 생체에 적용하는 것을 기피하는 경향도 있다. 따라서, 생체 적용이 인정되는 재료만을 이용하여 연골을 재생시키는 새로운 조성물의 개발이 필요한 실정이다.

- [5] 한편, 키 성장은 골의 길이가 증가해야 하는 것이고 이러한 골길이 성장은 연골내 골화과정(endochondral ossification)이 관여한다. 연골내 골화는 연골이 형성되고 그 중앙에 골화 중심이 출현하여 뼈를 형성하는 것으로, 골단판에서 일어나며 골길이 성장과 관련된다. 현재까지 키 성장을 촉진시킬 수 있는 약물로서 성장호르몬 주사를 주로 사용하고 있다.
- [6] 그러나, 성장호르몬이 직접 성장판의 연골세포 증식을 촉진하기도 하나 효과는 크지 않다. 성장호르몬이 간에 작용하면 분비되는 IGF-1(Insulin-like growth factor 1)이 연골세포를 증식시키는 주요 인자이다. 따라서, 성장호르몬 투여시 혈중 IGF-1 농도가 높아진다면 정상적으로 작용하는 것으로 판단하고, 성장호르몬이나 IGF-1이 연골세포에 작용하면 성장인자들이 분비되어 성장판이 증식하게 된다. 또한, 성장호르몬 주사는 호르몬 분비가 정상적으로 일어나고 있는 아이에게는 적합하지 않으며 사용시 오히려 갑상선기능 부전이나 뇌하수체기능 항진증과 같은 부작용을 일으키고, 값도 비싼 문제점을 갖는다. 이에, 성장판 연골의 증식을 촉진시켜 키 성장을 유도할 수 있는 물질의 개발이 시급한 실정이다.
- [7] 관절 연골(articular cartilage) 및 성장판 연골(growth plate cartilage)은 연골의 형태 중 유리질 연골(hyaline cartilage)에 해당된다. 이러한 연골조직의 세포 외 기질(extracellular matrix; ECM)은 콜라겐 타입 II(type II collagen), 어그리칸(aggrecan), 히알루론산(hyaluronan), HAPLN1(hyaluronan and proteoglycan link protein 1) 등이 주된 성분으로서 응집체(aggregate) 구조를 가진다. 여기서 히알루론산 사슬에 다수의 어그리칸이 결합하는데 HAPLN1은 이 둘의 결합을 더욱 강하게 결속시켜 응집체를 물리적 화학적으로 안정화하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 그러나 HAPLN1이 연골 관련 질환 또는 증상을 치료, 예방 또는 개선하는 효과를 가진다는 것에 대해서는 전혀 알려진 바가 없다.
- [8] 한편, 연골 관련 질환 또는 증상과 관련된 연구로서, 미국특허공개공보 제2016/0220699호에서는 하나 이상의 치료용 폴리뉴클레오타이드를 코딩하는 발현 벡터를 개체의 관절에 전달하는 단계를 포함하는, 연골세포 또는 연골형 세포를 생성하는 방법을 개시하고 있다. 또한 국제특허공개공보 제2017/123951호에서는 퇴행성 디스크 질환 환자에게 수핵(nucleus pulposus)으로부터 유래한 성분을 제공하는 단계를 포함하는, 연골세포 또는 이의 유사 세포를 생성하는 방법을 개시하고 있다. 그러나 상기 문헌들에는

HAPLN1을 이용한 연골 관련 질환 또는 증상의 예방, 개선, 또는 치료에 대해서 구체적으로 언급한 바 없다.

[9]

[10] [선행기술문헌]

[11] [특허문헌]

[12] 미국특허공개공보 제2016/0220699호(2016. 8. 4. 공개)

[13] 국제특허공개공보 제2017/123951호(2017. 7. 20. 공개)

[14]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[15] 본 발명은 HAPLN1을 이용하여 연골 관련 질환 또는 증상의 예방, 개선, 또는 치료용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[16] 구체적으로, 본 발명은 연골 재생용 조성물, 또는 골관절염 예방, 개선, 또는 치료용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다. 또한, 본 발명은 성장판 연골 증식용 또는 골길이 성장 촉진용 조성물, 또는 저신장증(short stature) 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결 수단

[17] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 히알루론산과 프로테오글리칸 연결 단백질 1(hyaluronan and proteoglycan link protein 1; HAPLN1)을 유효성분으로 포함하는 연골 재생용 약학 조성물, 연골 재생용 식품 조성물, 또는 연골 재생용 동물용 사료 조성물을 제공한다.

[18] 본 발명은 HAPLN1을 유효성분으로 포함하는 골관절염의 예방, 개선, 또는 치료용 약학 조성물, 식품 조성물 또는 동물용 사료 조성물을 제공한다.

[19] 본 발명은 HAPLN1을 유효성분으로 포함하는, 성장판 연골 증식용 또는 골길이 성장 촉진용 약학 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명은 HAPLN1을 유효성분으로 포함하는, 성장판 연골 증식용 및 골길이 성장 촉진용 식품 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명은 HAPLN1을 유효성분으로 포함하는, 성장판 연골 증식용 및 골길이 성장 촉진용 동물용 사료 조성물을 제공한다.

[20] 본 발명은 HAPLN1을 유효성분으로 포함하는 골길이 성장 장애 치료 또는 예방용 약학 조성물을 제공한다. 본 발명의 골길이 성장 장애는 저신장증, 소인증, 왜소증 또는 성조숙증일 수 있다.

발명의 효과

[21] 본 발명에 따르면, HAPLN1 단백질은 연골 형성 촉진 및 관절연골 재생능을 가지며, 연골세포의 TGF- β 수용체 I 단백질의 발현 수준을 증가시켜 연골 형성능 보유 세포를 증가시키고, 연골 조직의 재생을 유도할 수 있다. 따라서, 본 발명의 HAPLN1 단백질은 TGF- β 의 신호전달을 조절하는 물질로 연골 재생용 약학 조성물, 연골 재생용 식품 조성물 또는 연골 재생용 동물용 사료 조성물로

유용하게 활용될 수 있다,

- [22] 또한, 본 발명에 따르면 HAPLN1 단백질을 사용함으로써 골관절염을 예방, 개선, 또는 치료할 수 있는 유용한 조성물을 제공할 수 있다.
- [23] 또한, HAPLN1 단백질은 성장판 연골을 증식시키고 골길이 성장을 촉진함으로써, 기존의 호르몬제에 비해 부작용이 적고 우수한 효과를 갖는, 키 성장 치료제 및 보조제로 제공될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [24] 도 1은 Expi™ 293 세포를 단백질 발현시스템으로 이용하여 얻어진 재조합 인간 HAPLN1 단백질에 대한 SDS-PAGE 분석 결과를 나타낸다.
- [25] 도 2는 노화 마우스의 퇴화된 성장판에 대해 HAPLN1 단백질의 반복 복강투여로 인한 연골 형성능을 확인한 것으로서, 도 2(A)는 조직 내 프로테오글리칸을 사프란인 O/패스트 그린 FCF(Safranin O/Fast Green FCF) 염색법으로 확인한 것이며, 도 2(B)는 연골 형성능을 보유한 연골세포의 존재를 면역조직화학법(immunohistochemistry)으로 확인한 것이다.
- [26] 도 3은 마우스의 손상된 무릎 관절조직에 대해 관절강 내로 투여된 HAPLN1 단백질의 연골 재생능을 면역형광염색법(immunofluorescence)으로 확인한 것이다.
- [27] 도 4는 인간 관절 연골세포에 대한 HAPLN1 단백질의 연골 형성 촉진능을 확인한 것으로서, 도 4(A)는 연골-특이 유전자 SOX9과 연골 기질 구성물인 어그리칸 및 콜라겐 타입 II의 유전자 발현량을 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR)을 통해 확인한 것이며, 도 4(B)는 세포 외 기질에 축적된 프로테오글리칸을 사프란인 O/패스트 그린 FCF 염색법으로 확인한 것이다.
- [28] 도 5는 마우스 관절 연골세포에 대한 HAPLN1 단백질의 TGF- β 신호전달 조절능을 확인한 것으로서, 도 5(A)는 HAPLN1 단백질의 TGF- β 수용체 I 조절능을 웨스턴 블랏(western blot)으로 확인한 것이며, 도 5(B) 및 5(C)는 HAPLN1 단백질의 TGF- β 수용체 I 안정화를 중합효소연쇄반응 및 웨스턴 블랏으로 확인한 것이며, 도 5(D)는 HAPLN1 단백질에 의한 세포 표면 TGF- β 수용체 I 제시능 향상을 웨스턴 블랏으로 확인한 것이다.
- [29] 도 6은 HAPLN1 단백질의 골관절염 개선능을 분석하기 위해 사용된 6개의 마우스 실험군을 요약한 모식도를 나타낸다.
- [30] 도 7은 골관절염 유발 마우스에서 HAPLN1 단백질의 관절연골조직 형태 개선능을 확인한 것으로서, 도 7(A)는 각 마우스 실험군에서의 관절연골조직 형태를 사프란인 O/패스트 그린 FCF(Safranin O/Fast Green FCF) 염색법으로 확인한 것이며, 도 7(B)는 HAPLN1 단백질의 골관절염 개선능을 골관절염 조직병리학적 평가법(OARSI score)을 통해 정량화한 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [31] 본 발명의 발명자들은 노화 마우스 및 관절 연골 손상 마우스에서 HAPLN1

단백질에 의한 연골 형성 촉진능 및 연골 재생능을 확인하였다. 또한, 연골세포에서 HAPLN1 단백질에 의한 우수한 연골 형성 촉진능 및 연골 재생능을 확인하였다. 또한, HAPLN1 단백질이 연골세포의 TGF- β 수용체 I 단백질을 선택적으로 안정하게 증가시키는 것을 확인하며 본 발명을 완성하였다.

- [32] 본 발명은 HAPLN1 단백질을 유효성분으로 포함하는 연골 재생용 약학 조성물을 제공한다. 바람직하게는, 상기 HAPLN1 단백질은 연골 형성을 촉진하고, 관절 연골을 보호할 수 있다. 더욱 바람직하게는, 상기 HAPLN1 단백질은 TGF- β 수용체 I 단백질을 선택적으로 안정하게 증가시켜 연골 형성능 보유 세포를 증가시키고, 연골 조직의 재생을 유도할 수 있다.
- [33] 일 실시태양에서, 본 발명은 유효량의 HAPLN1 단백질을 연골 재생을 필요로 하는 대상체(subject)에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 연골을 재생하는 방법을 제공한다. 본원에서 사용된 용어 "대상체"는 인간 및 비-인간 동물을 포함한다. 비-인간 동물은 모든 척추동물, 예를 들어 포유류 및 비-포유류, 예컨대 비-인간 영장류, 양, 개, 소, 말 등을 포함한다.
- [34] 또다른 실시태양에서, 본 발명은 연골 재생을 위한 HAPLN1 단백질의 용도를 제공한다.
- [35] 본 발명은 또한 HAPLN1 단백질을 유효성분으로 포함하는 연골 재생용 식품 또는 동물용 사료 조성물을 제공한다.
- [36] 본 발명은 HAPLN1 단백질을 유효성분으로 포함하는 골관절염의 예방, 개선, 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [37] 본원에서 사용된 용어 "골관절염"은 흔히 퇴행성 관절염으로 불리는 질환으로, 뼈의 관절면을 감싸고 있는 관절 연골이 마모되어 연골 밑의 뼈가 노출되고, 관절 주변의 활액막에 염증이 생겨서 통증과 변형이 발생하는 질환이며, 당업계에서 일반적으로 이해하고 통용되는 의미로 해석된다. 외형적으로는 뼈 가장자리 부분에 골증식체(osteophyte)라 불리는 뼈가 자라나게 되어 마디가 튀어나오게 되고 관절 변형이 일어나게 된다. 현재 골관절염을 완전히 치료하는 치료법은 없으며, 약물요법으로는 진통제를 사용하여 단순히 통증을 완화하거나, 염증 완화를 위해 비스테로이드계(NSAID) 소염제를 사용하기도 한다.
- [38] 본 발명의 HAPLN1 단백질을 사용하는 경우, 골관절염이 발병한 관절연골조직을 개선하여 정상 연골과 유사한 형태를 갖게 된다. 나아가, HAPLN1 단백질을 사용시 관절면의 손상 정도를 감소시키고, 섬유화(fibrosis) 및 골증식체(osteophyte)의 수도 감소시킴으로써, 골관절염의 진행이 예방, 억제 또는 개선될 수 있다.
- [39] 일 실시태양에서, 본 발명은 유효량의 HAPLN1 단백질을 골관절염의 예방, 개선, 또는 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 골관절염을 예방, 개선, 또는 치료하는 방법을 제공한다.

- [40] 또다른 실시태양에서, 본 발명은 골관절염의 예방, 개선, 또는 치료를 위한 HAPLN1 단백질의 용도를 제공한다.
- [41] 본 발명은 또한 HAPLN1 단백질을 유효성분으로 포함하는 골관절염의 예방 또는 개선용 식품 또는 동물용 사료 조성물을 제공한다.
- [42] 본 발명은 HAPLN1 단백질을 유효성분으로 포함하는 성장판 연골 증식용 또는 골길이 성장 촉진용 약학 조성물을 제공한다.
- [43] 본 발명의 HAPLN1 단백질은 성장판 내 연골 형성을 촉진하여, 성장판 활성을 증진시키고, 성장판을 강화한다. 이에 따라 HAPLN1 단백질은 골길이 성장 장애 치료 또는 예방을 위해서도 사용될 수 있다. 이 때 상기 골길이 성장 장애는 저신장증, 소인증, 왜소증 또는 성조숙증을 비제한적으로 포함한다.
- [44] 일 실시태양에서, 본 발명은 유효량의 HAPLN1 단백질을 성장판 연골 증식 또는 골길이 성장 촉진을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 성장판 연골을 증식하거나 또는 골길이 성장을 촉진하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 유효량의 HAPLN1 단백질을 골길이 성장 장애의 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 골길이 성장 장애를 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.
- [45] 또다른 실시태양에서, 본 발명은 성장판 연골 증식 또는 골길이 성장 촉진을 위한 HAPLN1 단백질의 용도를 제공한다. 본 발명은 또한 골길이 성장 장애의 치료 또는 예방을 위한 HAPLN1 단백질의 용도를 제공한다.
- [46] 본 발명은 또한 HAPLN1 단백질을 유효성분으로 포함하는 성장판 연골 증식용 및 골길이 성장 촉진용 식품 또는 동물용 사료 조성물을 제공한다.
- [47] 본 발명은 연골 세포에 HAPLN1을 처리하여 연골 조직을 재생시키는 방법을 제공한다. 구체적으로, 연골 세포를 대상체로부터 분리하는 단계; 및 HAPLN1을 연골 세포에 처리하는 단계를 포함하는, HAPLN1을 이용하여 시험관 내에서(in vitro) 연골 조직을 재생시키는 방법을 제공한다.
- [48] 본 발명의 조성물이 약학 조성물인 경우, 투여를 위하여, 상기 기재한 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다.
- [49] 본 발명의 조성물이 식품 조성물인 경우, 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.
- [50]
- [51] 이하에서는 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [52]

- [53] **제조예: HAPLN1 단백질의 제조**
- [54] 단백질 정제를 용이하게 하기 위해 10개의 히스티딘이 결합되는 제조합 인간형 HAPLN1 유전자를 합성한 후 플라스미드 pcDNA3.4-TOPO에 삽입시키고, 단백질 발현시스템을 이용하여 Expi™ 293 세포에 형질감염시켰다. 배양 3일 후 세포배양액을 채취하였고, 단백질을 정제하기 위해 킬레이트 칼럼인 HisTrap 칼럼에 통과시킨 후, 0.5 M NaCl 함유하는 이미다졸 PBS 완충용액을 이용하여 20 mM 내지 500mM 이미다졸 염도 구배로 용출시켜 정제하였다. 그 후 결합되어 있는 히스티딘을 제거하기 위해 TEV protease를 처리한 후, 첨가된 TEV protease는 다시 DynaBeads를 이용하여 제거하였다. 생성된 HAPLN1 단백질을 SDS-PAGE에 로딩시켜 정제된 단백질을 확인하였다(도 1). 이후 정제도를 확인하여 순도 98% 이상의 단백질을 얻었으며 이를 in vitro 세포 실험 또는 in vivo 효능 시험에 사용하였다.
- [55]
- [56] **실시예 1: 생체 내(in vivo) 퇴화된 연골조직에서 HAPLN1 단백질에 의한 연골 재생능 분석**
- [57] **1-1. HAPLN1 단백질의 반복 복강투여에 의한 퇴화된 성장판 내 연골 형성 촉진**
- [58] 6주령의 수컷 C57BL/6 마우스를 어린(Young) 군으로, 20개월령의 C57BL/6 마우스를 노화(Old) 군으로 분류하고, 노화 군에는 HAPLN1 단백질을 인산완충식염수(phosphate buffered saline; PBS)에 희석하여 0.1 mg/kg의 용량으로 2주간 매일 복강투여 하는 한편, 대조군은 PBS를 동등한 방법으로 복강투여 하였다.
- [59] 각 군의 마우스 대퇴골 및 무릎 관절 부위를 취하여 중성완충 10% 포르말린(neutral buffered 10% formalin; NBF)으로 48시간 동안 고정시키고, 연속하여 10% 에틸렌디아민테트라아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA) 용액으로 7일간 탈회 과정을 수행하였다. 이어서 각 검체를 파라핀(paraffin)에 포매(embedding)하여 파라핀 블록을 제조하였으며, sagittal 방향으로 5 µm 두께의 조직 절편 슬라이드를 제조하였다. 조직학적 평가를 위해, 각 조직 절편 슬라이드의 연골조직은 사프란인 O/패스트 그린 FCF(safranin O/fast green FCF; SO/FG) 염색법을 수행하여 시각화하였다. 염색이 완료된 조직절편의 관찰은 Ni-U(Nikon) 현미경 및 DS-Ri1(Nikon) 디지털 카메라를 이용하여 촬영하였으며, 그 결과를 도 2(A)에 나타내었다(축척 막대 = 1 mm).
- [60] 도 2(A)에서 보는 바와 같이, 어린 대조군(Young Control)과 비교하였을 때, 노화 대조군(Old Control)의 성장판은 퇴화하여 연골조직의 흔적만 확인할 수 있는 반면, HAPLN1 단백질을 반복적으로 복강투여 받은 노화군(Old HAPLN1)에서는 퇴화한 성장판에 연골이 형성된 것을 확인할 수 있었다(화살표 머리).
- [61]
- [62] **1-2. HAPLN1 단백질의 반복 복강투여에 의한 연골 형성능 보유 연골세포의**

형성 및 증가

- [63] 상기 실시예 1-1로부터, HAPLN1 단백질의 반복 복강투여로 인해 유도된 연골 형성 부위에 연골 형성능을 보유한 세포의 존재 여부를 확인하기 위해, 해당 부위에 대하여 연골-특이 전사인자(cartilage-specific transcription factor)인 SOX9을 면역조직화학법(immunohistochemistry; IHC)을 이용하여 염색하였다. 염색이 완료된 조직절편의 관찰은 Ni-U(Nikon) 현미경 및 DS-Ri1(Nikon) 디지털 카메라를 이용하여 촬영하였으며, 그 결과를 도 2(B)에 나타내었다(축척 막대 = 1 mm).
- [64] 도 2(B)에서 보는 바와 같이, 어린 대조군(Young Control)에서는 SOX9을 발현하는 세포를 연골조직 내 전반적으로 보유하고 있는 반면, 노화 대조군(Old Control)에서는 SOX9을 발현하는 세포를 전혀 발견할 수 없었다. 그러나 HAPLN1 단백질을 반복적으로 복강투여 받은 노화군(Old HAPLN1)의 연골 형성 자극 부위에서 SOX9을 발현하는 세포들이 다수 발견되는 것을 확인할 수 있었다(화살표).
- [65] 따라서, HAPLN1 단백질은 성장판 연골을 증식 또는 재생시켜, 성장판 강화 및 골길이 성장을 촉진시키는 것을 알 수 있다.
- [66]
- [67] 실시예 2: 생체 내(in vivo) 손상된 연골조직에서 HAPLN1 단백질에 의한 연골 재생능 분석
- [68] 7주령의 수컷 C57BL/6 마우스를 다음과 같이 3개의 군으로 분배하였다. 정상 대조군(Sham Control군)은 destabilization of medial meniscus(DMM) 시술에 대한 모의 시술군(sham operation)으로서, 시술 후 4주 동안 기존의 조건으로 사육하였다. Vehicle 처치군(DMM Control군)은 DMM 시술 후 8주 동안 기존의 조건으로 사육하면서, 마지막 4주 동안은 주 1회 PBS를 관절강 내 투여하였다. HAPLN1 처치군(DMM HAPLN1군)은 DMM 시술 후 8주 동안 기존의 조건으로 사육하면서, 마지막 4주 동안은 주 1회 HAPLN1 단백질을 PBS에 1 µg/mL 농도로 희석하여 관절강 내 투여하였다.
- [69] 사육 종료 시, 시술 및 처치가 적용된 무릎 조직을 적출하여 NBF로 48시간 동안 고정시키고, 연속하여 10% EDTA 용액으로 7일간 탈회 과정을 수행하였다. 이어서 각 검체를 파라핀에 포매하여 파라핀 블록을 제조하였으며, sagittal 방향으로 5 µm 두께의 조직 절편 슬라이드를 제조하였다. 면역형광염색법(immunofluorescence; IF)을 이용하여 콜라겐 타입 II(type II collagen; Col2)를 녹색 형광으로 염색하였고, 세포의 핵은 4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)를 이용하여 파랑 형광으로 염색하였다. 염색이 완료된 조직절편의 관찰은 Ni-U(Nikon) 현미경 및 DS-Ri1(Nikon) 디지털 카메라를 이용하여 촬영하였으며, 그 결과를 도 3에 나타내었다(축척 막대 = 200 µm).
- [70] 도 3에서 보는 바와 같이, 정상 대조군(Sham Control군)에서 발견되는 콜라겐

타입 II 발현 세포의 수가 Vehicle 처치군(DMM Control군)에서 크게 감소되어 있는 반면, HAPLN1 처치군(DMM HAPLN1군)에서 콜라겐 타입 II 발현 세포의 수가 크게 증가되는 것을 확인할 수 있었다(화살표 머리).

- [71] 따라서, HAPLN1 단백질은 연골 재생에 우수한 효과를 갖는 것을 알 수 있다.
- [72]
- [73] 실시예 3: HAPLN1 단백질의 시험관 내(in vitro) 연골 형성 촉진능 분석
- [74] 3-1. HAPLN1 단백질에 의한 인간 관절 연골세포의 연골 형성능 증가
- [75] 인간 관절 연골세포(human articular chondrocyte; HAC)는 10% 소태아혈청(fetal bovine serum; FBS; Gibco), 1% 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin; Gibco), 1% 비필수아미노산(non-essential amino acid; NEAA; Gibco)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle medium/F12 1:1 혼합(DMEM/F12; Gibco) 배지 내에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양되었다.
- [76] HAC의 연골형성능을 시험하기 위한 모델로서 알긴산염 구슬(alginate bead) 내에 세포를 포매하는 3차원 배양 시스템을 이용하였다. 1.25% 알긴산염(alginate) 용액에 HAC를 균일하게 혼합하여 구슬 당 30,000개의 세포가 포함되도록 하였다. 이들은 상기 성장배지에 50 µg/mL L-아스코르브산 2-인산(L-ascorbic acid 2-phosphate), 1% ITS(insulin-transferrin-selenium; Gibco) 및 10 ng/mL TGF-β1을 첨가하여 배양하였으며, HAPLN1 처리군은 50 ng/mL HAPLN1을 추가로 첨가하였다. 배양은 37°C, 5% CO₂ 조건으로 7일 내지 28일 동안 지속되었다.
- [77] 배양 종료 시, 알긴산염 구슬에 포매된 HAC를 회수하기 위해, 55 mM EDTA 용액으로 알긴산염을 용해시킨 후 500 xg에서 3분간 원심분리(centrifugation)하였다. 원심분리 후 획득한 세포로 RNA 추출 및 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR)을 수행하여 유전자 발현 양상을 비교분석 하였으며, 그 구체적인 과정은 다음과 같다.
- [78] TRIzol(Thermo Scientific) 용액을 이용하여 제조사의 지시사항에 따라 RNA를 추출하였다. 획득한 RNA 0.1 µg으로부터 oligo-dT20 프라이머(primer)와 SuperScript III First-Strand Synthesis Supermix(Invitrogen)를 이용하여 first-strand cDNA를 합성하였다. 획득한 cDNA는 iQ SYBR Green Supermix(Bio-rad)를 이용하여, 각 관심 유전자에 대한 200 nM 프라이머와 함께 PCR을 진행하였다. 반응 조건으로는 최초 5분간 95°C를 유지시킨 후, 95°C 10초, 62°C 15초, 72°C 20초의 3단계 과정을 45회 반복하였다. 증폭신호는 CFX Connect(Bio-rad)로 실시간 측정되었고, 관심 유전자의 발현량은 각자의 GAPDH 발현량에 대한 상대값으로 산출되었다. 그 결과를 도 4(A)에 나타내었으며, PCR에 사용된 각 인간 유전자에 대한 프라이머 서열은 다음과 같다.
- [79]

[80] [표1]

SOX9	forward	5'-AGCGAACGCACATCAAGAC-3'
	reverse	5'-CTGTAGGCGATCTGTTGGGG-3'
ACAN	forward	5'-GTGCCTATCAGGACAAGGTCT-3'
	reverse	5'-GATGCCTTTCACCACGACTTC-3'
COL2A1	forward	5'-TGGACGCCATGAAGGTTTCT-3'
	reverse	5'-TGGGAGCCAGATTGTCATCTC-3'
GAPDH	forward	5'-CTGGGCTACACTGAGCACC-3'
	reverse	5'-AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG-3'

[81] 도 4(A)에서 보는 바와 같이, HAPLN1 단백질은 HAC로 하여금 SOX9 유전자 발현을 증가시킴과 동시에, 어그리칸(aggrekan; ACAN) 및 콜라겐 타입 II(type II collagen; COL2A1)의 유전자 발현을 증가키는 것을 확인할 수 있었다.

[82]

[83] 3-2. HAPLN1 단백질에 의한 인간 관절 연골세포의 세포 외 기질 내 프로테오글리칸 축적 증가

[84] 상기 실시예 3-1로부터, HAPLN1 첨가에 의한 연골 기질의 세포 외 축적을 평가하기 위해, 배양 28일째의 알긴산염 구슬을 NBF로 15분간 고정하고, OCT compound(Sakura) 내에서 액체질소에 의해 동결하였다. 이로부터 두께 5 μ m의 동결절편을 얻어, 아세톤(acetone) 고정 후 사프라닌 O/패스트 그린 FCF 염색으로 시각화하였다. 염색된 조직절편의 관찰은 Ni-U(Nikon) 현미경 및 DS-Ri1(Nikon) 디지털 카메라를 이용하여 촬영하였으며, 그 결과를 도 4(B)에 나타내었다(축척 막대 = 250 μ m).

[85] 도 4(B)에서 보는 바와 같이, HAPLN1 단백질이 포함된 배지에서 배양된 HAC의 알긴산염 구슬에서는, 그 대조군에 비해, 사프라닌 O에 의해 염색된 프로테오글리칸의 축적이 크게 증가되었음을 확인할 수 있었다.

[86]

[87] 실시예 4: HAPLN1 단백질에 의한 TGF- β 신호전달 조절능 분석

[88] 4-1. HAPLN1 단백질에 의한 마우스 관절 연골세포의 TGF- β 수용체 I(T β R1)의 단백질량 증가

[89] 5일령의 ICR 마우스의 양쪽 다리 관절 연골로부터 미성숙 마우스 관절 연골세포(immature murine articular chondrocyte; iMAC)를 분리하였다. 획득한 iMAC은 10% FBS(Gibco), 1% 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin; Gibco), 1% NEAA(Gibco)가 포함된 DMEM/F12(Gibco) 배지 내에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양되었다.

[90] 플레이트 바닥에 고밀도로 배양된 iMAC에 100 ng/mL HAPLN1을 3시간 내지

72시간 동안 처리한 후 세포를 수집하고, RIPA(radioimmunoprecipitation assay) 완충액 내에서 단백질을 추출하였다. 그 다음 웨스턴 블랏(western blot)을 수행하여 TGF- β 수용체 I(T β R1), ALK1(activin receptor-like kinase 1), TGF- β 수용체 II(T β R2) 및 Gapdh의 단백질 발현 수준을 확인하였으며, 그 결과를 도 5(A)에 나타내었다.

- [91] 도 5(A)에서 보는 바와 같이, HAPLN1 단백질에 의해 iMAC의 TGF- β 수용체 I(T β R1)의 단백질 발현 수준이 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 한편, ALK1(activin receptor-like kinase 1) 및 TGF- β 수용체 II(T β R2)의 발현 수준은 변동이 없음을 확인할 수 있었다.

[92]

- [93] 4-2. HAPLN1 단백질에 의한 마우스 관절 연골세포의 TGF- β 수용체 I(T β R1)의 안정성 증가

- [94] 상기 실시예 4-1에서 보인 HAPLN1 단백질에 의한 TGF- β 수용체 I(T β R1) 단백질 수준 증가가 안정성 증가에 의한 결과임을 검증하기 위해, 동일한 실험조건 하에 24시간 및 72시간 동안 배양한 세포로부터, 단백질 수준을 비교하였던 세가지 유전자의 발현 양상을 비교분석함과 동시에, 단백질 생합성(de novo synthesis)을 제한한 환경에서 HAPLN1에 의한 TGF- β 수용체 I(T β R1) 단백질 수준 증가를 검증하였다.

- [95] 이를 위한 RNA 추출 및 PCR 과정은 다음과 같다.

- [96] TRIzol(Thermo Scientific) 용액을 이용하여 제조사의 지시사항에 따라 RNA를 추출하였다. 획득한 RNA 0.1 μ g으로부터 oligo-dT20 프라이머와 SuperScript III First-Strand Synthesis Supermix(Invitrogen)를 이용하여 first-strand cDNA를 합성하였다. 획득한 cDNA는 iQ SYBR Green Supermix(Bio-rad)를 이용하여, 각 관심 유전자에 대한 200 nM 프라이머와 함께 PCR을 진행하였다. 반응 조건으로는 최초 5분간 95°C를 유지시킨 후, 95°C 10초, 61°C 15초, 72°C 20초의 3단계 과정을 45회 반복하였다. 증폭신호는 CFX Connect(Bio-rad)로 실시간 측정되었고 관심 유전자의 발현량은 각자의 Gapdh 발현량에 대한 상대값으로 산출되었다. 그 결과를 도 5(B)에 나타내었으며, PCR에 사용된 각 마우스 유전자에 대한 프라이머 서열은 다음과 같다.

[97]

[98] [표2]

Tgfb1	forward	5'-GTCAGTGGAGTTGTACGGCA-3'
	reverse	5'-GGGCTGATCCCGTTGATTTTC-3'
Acvrl1	forward	5'-CTGGGTGCTCTAGGCTTGTG-3'
	reverse	5'-GCCCCGTAGTACAGTCGCTG-3'
Tgfb2	forward	5'-AACAGTGATGTCATGGCCAG-3'
	reverse	5'-CAGACTTCATGCGGCTTCTC-3'
Gapdh	forward	5'-TGGCCTTCCGTGTTCTTCTAC-3'
	reverse	5'-GAGTTGCTGTTGAAGTCGCA-3'

[99] 또한, 플레이트 바닥에 고밀도로 배양된 iMAC에 10 μ M cycloheximide(CHX)를 처리하여 노출시키는 동안, cycloheximide(CHX)를 처리하기 0.5시간 전(pre) 혹은 0.5시간 후(post)부터 200 ng/mL HAPLN1을 처리하였다. Cycloheximide(CHX) 처리 24시간 후, PBS로 플레이트를 세포가 부착된 상태로 세척하고, 세포를 수집하여 RIPA 완충액 내에서 단백질을 추출하였다. 추출된 용해물(cell lysate)로 웨스턴 블랏을 수행하여 TGF- β 수용체 I(T β R1), ALK1(activin receptor-like kinase 1), TGF- β 수용체 II(T β R2) 및 Gapdh의 단백질 발현 수준을 확인하였으며, 그 결과를 도 5(C)에 나타내었다.

[100] 도 5(B)와 5(C)에서 보는 바와 같이, HAPLN1 단백질에 의해 iMAC의 TGF- β 수용체 I(T β R1), ALK1(activin receptor-like kinase 1), TGF- β 수용체 II(T β R2) 중 어느 것도 그 유전자 발현이 유도 혹은 억제되지 않음을 확인할 수 있었다. 한편, HAPLN1 단백질에 의해 TGF- β 수용체 I(T β R1)은, 단백질 발현 수준이 변동되지 않은 ALK1(activin receptor-like kinase 1)과 TGF- β 수용체 II(T β R2)와는 달리, 그 발현 수준이 증가됨을 확인할 수 있었다. 이는 HAPLN1 단백질이 TGF- β 수용체 I(T β R1) 유전자에 대한 전사를 유도하지 않고 그 단백질의 반감기를 증가시켰음을 나타내며, 이는 iMAC이 보유한 TGF- β 수용체 I(T β R1) 단백질의 안정성이 증가되었음을 나타낸다 할 수 있다.

[101]

[102] 4-3. HAPLN1 단백질에 의한 마우스 관절 연골세포의 TGF- β 수용체 I(T β R1)의 세포표면 제시량 증가

[103] 플레이트 바닥에 고밀도로 배양된 iMAC에 10 μ M cycloheximide(CHX)를 처리하여 노출시키는 동안, cycloheximide(CHX)를 처리하기 0.5시간 전(pre) 혹은 0.5시간 후(post)부터 200 ng/mL HAPLN1을 처리하였다. Cycloheximide(CHX) 처리 24시간 후, PBS로 플레이트를 세포가 부착된 상태로 세척하고, EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin(Thermo Scientific)을 2시간 동안 반응시켜 세포 표면 단백질을 비오틴(biotin) 표지하였다. 0.1 M glycine 용액으로 반응을 종결시킨 후,

세포를 수집하여 NP-40 lysis buffer(Bioworld) 내에서 단백질을 추출하였다. 추출된 용해물에서 비오틴(biotin) 항체와 자성 구슬(magnetic bead)을 이용한 면역침강법을 통해 비오틴(biotin)이 표지된 세포 표면 단백질만 선택적으로 추출하였으며, 이렇게 얻은 분획물로 웨스턴 블랏을 수행하여 TGF- β 수용체 I(T β R1), ALK1(activin receptor-like kinase 1), TGF- β 수용체 II(T β R2) 및 Gapdh의 단백질 발현 수준을 확인하였으며, 그 결과를 도 5(D)에 나타내었다.

- [104] 도 5(D)에서 보는 바와 같이, HAPLN1 단백질에 의해 iMAC의 세포 표면에 제시되고 있는 TGF- β 수용체 I(T β R1) 단백질의 발현 수준이 증가되는 것을 확인할 수 있음과 동시에, ALK1(activin receptor-like kinase 1) 및 TGF- β 수용체 II(T β R2)의 발현은 변동이 없음을 확인할 수 있었다.
- [105] 따라서, HAPLN1 단백질은 TGF- β 수용체 I(T β R1) 단백질을 선택적으로 안정하게 증가시키는 것을 알 수 있다.
- [106]
- [107] **실시예 5: 생체 내(in vivo) 투여된 HAPLN1 단백질에 의한 골관절염 개선능 분석**
- [108] 5-1. 골관절염 유발 마우스에서 HAPLN1 단백질의 관절염골조직 형태 개선능 평가
- [109] HAPLN1 단백질의 골관절염 개선능을 분석하기 위해, 마우스 무릎 관절 내 측 반월경골 인대(medial meniscotibial ligament)를 절단하여 골관절염을 유발하는 질병모델로서 destabilization of medial meniscus(DMM) 시술 골관절염 모델을 사용하였다.
- [110] 7주령 수컷 C57BL/6 마우스를 6개의 실험군으로 분배하여 다음과 같이 처치하였다.
- [111] - 비수술 정상군(No surgery control, NC-4W)은 6마리를 배정(n=6)하여 어떠한 시술도 하지 않은 채 4주간 사육하였다.
- [112] - 모의 시술 정상군(Sham operation control, SC-4W)은 6마리를 배정(n=6)하여 모의 시술을 실시한 후 4주간 사육하였다.
- [113] - 경도 골관절염군(DMM 4-week control, DC-4W)은 6마리를 배정(n=6)하여 DMM 시술 후 4주간 사육하였다.
- [114] - 중등도 골관절염군(DMM 8-week control, DC-8W)은 9마리를 배정(n=9)하여 DMM 시술 후 4주간 사육하고, 이후 4주간 인산완충식염수(phosphate buffered saline; PBS)를 주 1회 관절강 내(intra-articular) 주사(5 μ L)하였다.
- [115] - 저용량 HAPLN1 투여군(DMM low dose HAPLN1, DL-8W)은 9마리를 배정(n=9)하여 DMM 시술 후 4주간 사육하고, 이후 4주간 PBS에 희석한 HAPLN1 단백질 0.1 μ g/mL를 주 1회 관절강 내(intra-articular) 주사(5 μ L)하였다.
- [116] - 고용량 HAPLN1 투여군(DMM high dose HAPLN1, DH-8W)은 9마리를 배정(n=9)하여 DMM 시술 후 4주간 사육하고, 이후 4주간 PBS에 희석한 HAPLN1 단백질 1.0 μ g/mL를 주 1회 관절강 내(intra-articular) 주사(5 μ L)하였다.

[117] 위의 실험군을 요약하면 표 3 및 도 6과 같다.

[118] [표3]

Grou p 1	NC-4W	No surgery normal control	비시술 4주 정상대조군	비시술 정상군
Grou p 2	SC-4W	Sham operation normal control	모의시술 4주 정상대조군	모의시술 정상군
Grou p 3	DC-4W	DMM 4-week control (early OA)	DMM 시술 4주 음성대조군	경도 골관절염군
Grou p 4	DC-8W	DMM 8-week control (moderate OA)	DMM 시술 8주 음성대조군	중등도 골관절염군
Grou p 5	DL-8W	DMM low dose HAPLN1	DMM 시술 8주 저용량 HAPLN1 투여군	저용량 HAPLN1 투여군
Grou p 6	DH-8W	DMM high dose HAPLN1	DMM 시술 8주 고용량 HAPLN1 투여군	고용량 HAPLN1 투여군

[119] 사육 종료시, 시술 및 처치가 적용된 무릎 조직을 적출하여 중성완충 10% 포르말린(neutral buffered 10% formalin; NBF)으로 48시간 동안 고정(fixation)하고, 이어서 10% 에틸렌다이아민테트라아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA) 용액으로 7일간 탈회(decalcification) 과정을 수행하였다. 이어서 각 검체를 파라핀(paraffin)에 포매하여 파라핀 블록을 제조하였으며, 5 μ m 두께의 sagittal 절편 슬라이드를 제조하였다.

[120] 관절연골 조직의 형태학적 평가를 위해, 각 조직 절편 슬라이드의 연골조직을 사프란인 O/패스트 그린 FCF(safranin O/fast green FCF; SO/FG) 염색법을 통해 시각화하였다. 염색이 완료된 조직절편의 관찰은 Ni-U(Nikon) 현미경 및 DS-Ri1(Nikon) 디지털 카메라를 이용하여 촬영하였으며, 그 결과를 도 7(A)에 나타내었다.

[121] 도 7(A)에 나타낸 바와 같이, 비시술 정상군(NC-4W)과 모의시술 정상군(SC-4W)은 관절연골이 온전한 상태임을 확인할 수 있었으며, 이에 비해 경도 골관절염군(DC-4W) 및 중등도 골관절염군(DC-8W)으로 갈수록 관절면에 소실이 발생하는 것을 확인할 수 있었다. 한편, 저용량 HAPLN1 투여군(DL-8W)과 고용량 HAPLN1 투여군(DH-8W)에서는 정상대조군의 관절연골 형태와 유사하게 나타나고, 고용량 HAPLN1 투여군(DH-8W)은 정상대조군과 거의 동일한 것을 확인할 수 있었다.

[122]

- [123] 5-2. HAPLN1 단백질의 골관절염 개선능에 대한 정량적 평가
- [124] HAPLN1 단백질의 골관절염 개선능을 수치화 하기 위해, 상기 실시예 5-1로부터 얻은 조직염색 슬라이드를 국제골관절염학회(Osteoarthritis Research Society International, OARSI)에서 제공하는 골관절염 조직병리학적 평가법(OARSI score)으로 평가하였다. 이 평가법은 관절면의 손상 정도와 섬유화(fibrosis) 및 골증식체(osteophyte) 여부를 수치화 하는 방법으로서, 점수가 높을수록 골관절염의 병리 진행이 빠른 것으로 판단한다.
- [125] 도 7(B)에서 보는 바와 같이, 비시술 정상군(NC-4W)과 모의시술 정상군(SC-4W)은 골관절염의 징후가 보이지 않았으며, 이에 비해 경도 골관절염군(DC-4W) 및 중등도 골관절염군(DC-8W)으로 넘어갈수록 골관절염이 시술 후 사육기간에 비례하여 진행되었음을 확인할 수 있었다.
- [126] 한편, 저용량 HAPLN1 투여군(DL-8W)과 고용량 HAPLN1 투여군(DH-8W)에서는 이들에 대한 음성대조군인 중등도 골관절염군(DC-8W)에 비해 골관절염 진행이 억제되었거나 골관절염이 개선되었음을 확인할 수 있었다. 또한, 이러한 진행 억제 및 개선능은 중등도 골관절염군(DC-8W)의 상태를 경도 골관절염군(DC-4W)과 동등한 수준으로 되돌렸음을 확인할 수 있었다.
- [127] 따라서, HAPLN1 단백질이 골관절염을 예방, 개선 또는 치료하는데 효과가 있는 것을 알 수 있다.